

方向式低溫顯微鏡系統之 研製與應用

龍 侃¹，林達德²

1. 國立台灣大學農業機械工程學研究所碩士
2. 國立台灣大學農業機械工程學研究所教授

摘 要

低溫顯微鏡為觀察生物細胞在低溫狀態下所產生外觀變化的最主要儀器，本研究之主要目的為改良原有方向式低溫顯微鏡冷凍臺之設計，並以微電腦為基礎進行冷凍臺之溫度控制。所研製完成的方向式低溫顯微鏡系統主要包括冷凍臺座、熱源和熱淵及其溫度控制系統、樣本溫度讀取界面、定位機構與驅動電路及樣本溫度控制軟體等五個子系統。系統於研製完成後進行組合與性能測試，其可控制之溫度範圍為-80°C至100°C。在熱源和熱淵溫度設定為40°C與-80°C的條件下，控制恆溫之平均平方根誤差約為0.3°C，冷凍速率可達-60°C/min。所完成之低溫顯微鏡系統並以牡蠣卵與胚體為對象進行實驗，實驗結果顯示，隨著時間的增長，胚體與卵發生IIF的機率隨之增加，且隨著所設定的恆溫之下降，發生IIF的機率也隨之增加。胚體與卵之⁵⁰T_{IIF}分別為-21.0°C與-22.5°C左右，而牡蠣胚體之IIF機率由0增加到1的轉變溫度範圍較卵為寬廣。

關鍵詞： 低溫顯微鏡，冷凍，細胞內凍結，牡蠣卵

IMPLEMENTATION AND APPLICATION OF A DIRECTIONAL CRYOMICROSCOPE SYSTEM

Ken Lung¹, Ta-Te Lin²

1. *Former Graduate Student, Dept. of Agricultural Machinery Engineering, National Taiwan University.*
2. *Professor, Dept. of Agricultural Machinery Engineering, National Taiwan University.*

ABSTRACT

Cryomicroscope is the most important instrument for the real-time observation of physical changes of biological cells at low temperature. The objectives of this research were to improve the original design of the directional cryomicroscope and to utilize microcomputer for temperature control. The cryomicroscope system was implemented and comprised five subsystems. They were:

the cold stage base, the heat source and heat sink with independent temperature control systems, the sample temperature acquisition interface, the positioning mechanism and interface, and the sample temperature control software. The five subsystems were integrated and the performance of the cryomicroscope system was tested. The sample temperature could be controlled in the range between -80°C and 100°C . When the temperatures of heat source and heat sink were set at 40°C and -80°C , the root mean squared error of isothermal control was about 0.3°C . A maximum cooling rate of $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ was obtained. The cryomicroscope system was also used to measure the IIF characteristics of oyster eggs and embryos. The IIF process of oyster eggs and embryos was found to be time and temperature dependent. The probability of IIF increased with time and lower temperature. The isotherm $^{50}T_{IIF}$ of eggs and embryos were determined to be -21.0°C and -22.5°C . The transition temperature zone of IIF probability from 0 to 1 appeared to be broader for embryos than that of eggs.

Keywords: Cryomicroscope, Freezing, Intracellular ice formation, Oyster eggs

一、前言與研究目的

細胞在低溫狀態下的特性一直是生物科學領域中的重要研究焦點，而低溫顯微鏡則是觀察生物細胞在低溫狀態下所產生外觀變化的主要儀器。早期對於生物細胞冷凍與解凍過程的顯微觀察，多是利用戶外的低溫環境或是將顯微鏡置於週邊為人工造成的冰冷環境中進行實驗，對於實驗過程的溫度範圍與冷凍解凍速率的控制均有極大的限制 (Diller, 1982)。隨著工程技術的演進，俱備較佳溫度控制與操作性能的低溫顯微鏡系統不斷推陳出新，不同設計的低溫顯微鏡系統被應用於觀察各種細胞在冷凍過程中之脫水現象 (Diller and Cravalho, 1970; Steponkus et al., 1984)，或是冷凍速率過快時致使細胞內產生凍結之現象 (Pitt and Steponkus, 1989; Toner et al., 1991)，及水溶液凍結過程中固液相界面之變化等諸多應用 (Korber et al., 1984; Kourosch and Diller, 1984)。有關低溫生物學的基礎理論，如冷凍解凍過程中造成細胞損傷的機制等 (Mazur, 1970)，藉由低溫顯微鏡的實際觀察而得以驗證及更深入地探討。

低溫顯微鏡的設計主要是在光學顯微鏡上架設一個經過特殊設計的冷凍臺，控制樣本在冷

凍臺上的溫度與降溫速率，以對樣本冷凍與解凍過程進行實時觀察。樣本溫度的控制，一般而言不外乎應用熱傳導或熱對流之基本原理，藉由冷媒（如液態氮）達到冷卻的效果，而利用電阻發熱的方式產生熱能，適當應用控制技術調整熱量的移除與加入以達到溫度控制之目的。Diller 與 Cravalho (1970) 首先應用熱對流原理設計冷凍臺，並以電子電路控制溫度來進行生物細胞冷凍過程的觀察，而後 McGrath 等人 (1975) 則又應用熱傳導原理設計了另一形式之冷凍臺。對流式冷凍臺的優點為其樣本區之溫度場較為均勻，而缺點則為冷凍臺之厚度較高，對顯微鏡物鏡與聚光鏡間之工作距離限制較大，以致影響顯微鏡的解析度。傳導式冷凍臺的優點為工作距離較短，且可達較高之冷卻速率，但是樣本區之溫度場梯度較高，是為其最大缺點 (Tu and McGrath, 1984)。Rubinsky 及 Ikeda (1985) 改良傳導式冷凍臺之圓形設計，應用移動樣本與熱源和熱淵相對位置而改變樣本溫度的觀念，設計出方向式冷凍臺。其原理是以承載樣本的玻片兩端分別為高溫與低溫銅塊，由於兩銅塊的溫差產生玻片上的溫度梯度，利用玻片的移動而產生樣本的溫度變化；藉改變玻片的移動速度，控制樣本降溫或升溫速率。此種形式的冷凍臺特點為冷卻速率可

藉由熱源和熱淵位置的調整與移動速度的控制而大幅提昇，適於需要較高冷卻速率實驗之進行。

近年來，隨著微電腦與控制理論的進展，微電腦界面技術應用於數位控制也日趨成熟。冷凍臺的溫度控制也捨棄了早期應用類比電路的控制方式，而多採用微電腦或數位電子電路加以控制，使得低溫顯微鏡系統之應用更具彈性 (McGann, 1979; Shah et al., 1987; 林, 1991)。本研究主要是以方向式冷凍臺的原理為基礎，改良低溫顯微鏡的冷凍臺設計與機構，並以個人電腦配合數位溫控系統控制樣本的升溫與降溫，達到觀察生物細胞冷凍與解凍過程之目的。主要之研究目的有：

1. 設計與製作方向式低溫顯微鏡冷凍臺。
2. 完成以微電腦為基礎的溫度控制界面並進行性能測試。
3. 利用所完成之低溫顯微鏡系統，以牡蠣卵與胚胎為實驗對象測定其細胞內凍結溫度。

二、設計原理

方向式冷凍臺之設計原理是將放置樣本之玻片兩端分別跨置於熱源和熱淵銅塊，熱淵以冷媒與電阻熱保持在固定的溫度，而熱源單純以電阻熱加熱，其中熱源溫度是高於樣本懸浮水溶液的凍結溫度，熱淵溫度則低於此溫度。玻片因放在熱源和熱淵間，由於熱傳導使得玻片溫度在熱源溫度與熱淵溫度間呈趨近線性變化的溫度 (Rubinsky et al., 1991)。樣本在玻片上，藉著等速移動玻片從高溫的熱源到低溫的熱淵以控制樣本的冷卻速率，從而觀察樣本在低溫下的變化。

最早由 Rubinsky 及 Ikeda (1985) 所設計的方向式低溫顯微鏡冷凍臺是由熱源和熱淵與支撐於顯微鏡上之臺座組成。熱源和熱淵由銅塊製成，放置在臺座上並使熱源和熱淵間保持一段微小的距離。熱源銅塊利用溫度控制器控制加熱電阻電流量的大小以維持恆溫。熱淵則有液態氮通道，由於液態氮的流通帶走熱量，再由溫控器控制加熱電阻維持低溫。熱淵和熱源的溫度維持在 -60°C 與 60°C ，精確度為 0.1°C 。玻片位置控制機構由馬達及螺桿組成，藉著位置控制機構使玻片

以一定的速度在熱源和熱淵之間移動以改變樣本的溫度，在熱源和熱淵位置固定而玻片移動的情形下，該系統中冷卻速率的控制是利用控制玻片的移動速度來達成，而在物鏡下的觀察對象則為樣本水溶液之固液相界面。

在本研究中主要改良原始設計的重點有兩項：一項為將熱源和熱淵改為移動部而固定放置樣本的玻片，以避免樣本隨玻片移動，而得以對其進行較長時間的觀察；另一項重點則於樣本區安置熱電偶以實際量測得樣本的溫度，並以此溫度回饋給微電腦進行樣本溫度之控制。

玻片上樣本的溫度變化不僅與熱源和熱淵之相對位置與溫度相關，同時亦受玻片上空氣對流之影響。若熱源和熱淵間的距離越遠，玻片與空氣之間的熱交換量相對於玻片與熱源和熱淵的熱傳量提高，則易對於玻片溫度的控制造成影響，故熱源和熱淵距離不宜過長，以減少空氣對流之影響。此外，玻片的熱容量也會影響玻片之溫度分佈，當熱容量大時，玻片移動後溫度到達穩定狀態所需之時間變長，亦為溫度控制之不利因子。而玻片熱容量與玻片的比熱及厚度有關，因此玻片材料與厚度的選擇亦對於方向式冷凍臺之性能有相當大之影響，必須於設計時慎重加以考量。

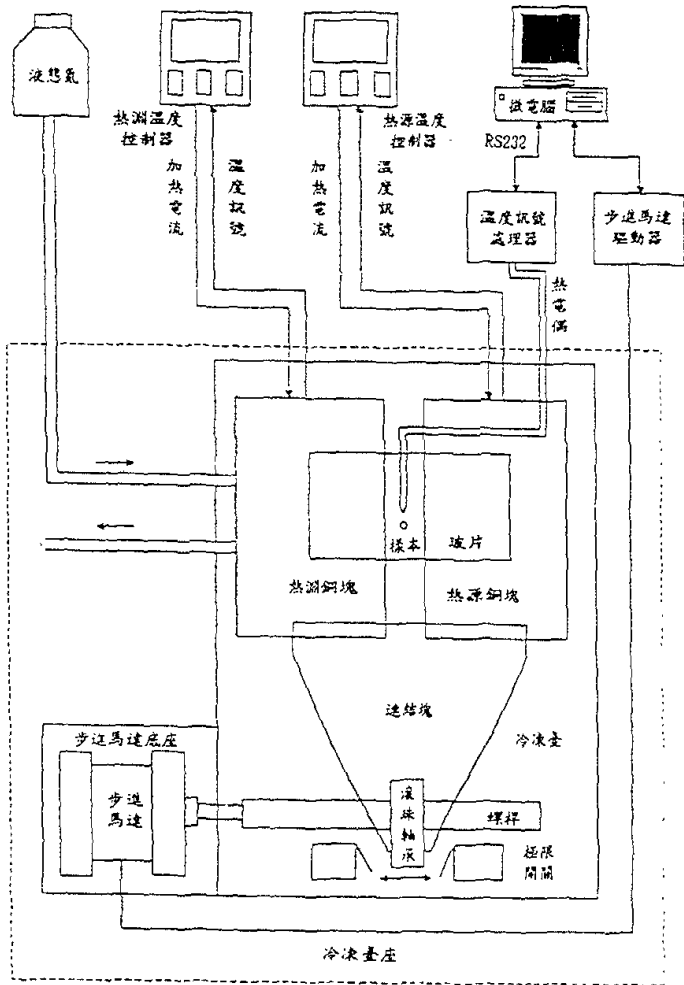
三、元件製作與組合

(一) 系統規劃

本研究中所研製的微電腦方向式低溫顯微鏡系統如圖一所示，包括了五個部分：(1) 冷凍臺座，(2) 熱源和熱淵及其溫度控制系統，(3) 樣本溫度讀取界面，(4) 熱源和熱淵定位機構及驅動電路，(5) 樣本溫度控制軟體。

冷凍臺座架設於光學顯微鏡 (Olympus Co., Model: BH2, Japan) 上，以安置控制樣本溫度的熱源和熱淵銅塊及定位機構。熱源和熱淵由銅塊加工製成，各使用一個溫度控制器控制銅塊溫度維持恆溫，控制器的輸入端為熱電偶所量取之銅塊溫度訊號，輸出則為通過加熱電阻之電流，以控制銅塊維持恆溫。樣本的溫度控制是以微電腦溫度訊號處理界面讀取位於樣本區的熱電偶訊號，再以微電腦中之控制程式計算輸出訊號，以

驅動定位熱源和熱淵與玻片相對位置之步進馬達，而達到溫度控制之目的。



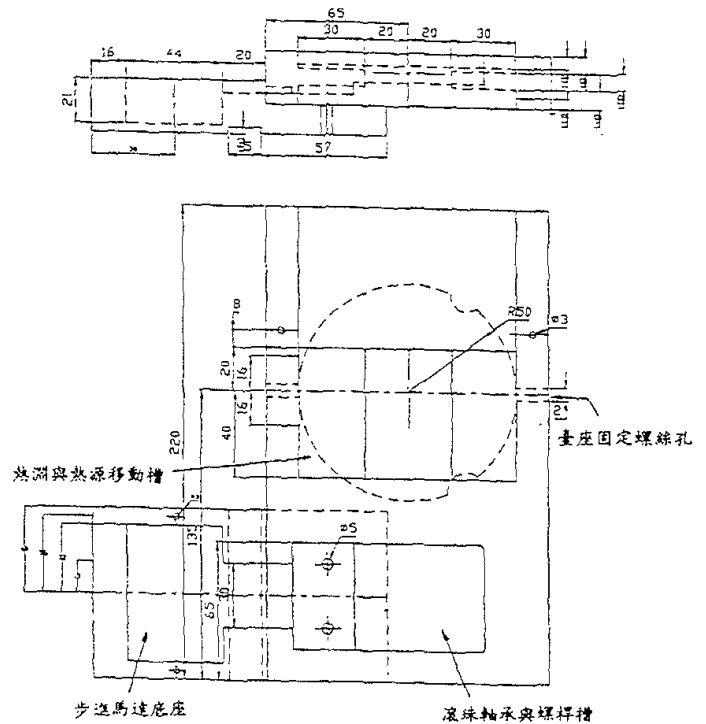
圖一 方向式冷凍臺之系統構成

(二) 冷凍臺座之設計與製作

冷凍臺座連結於顯微鏡系統下，設計上分為前後兩部分。前端是顯微鏡觀察樣本的工作區，放置有熱源和熱淵。臺座後端則放置熱源和熱淵定位機構。藉著連結塊與熱源和熱淵連結。為了減少熱源和熱淵與臺座接觸面之間的熱傳導，臺座選擇具低熱傳導係數與低熱膨脹性質之電木加工製成。

使用顯微鏡觀察樣本時，由於聚光鏡與接物鏡間之工作距離對放大倍率有直接影響，使得臺座因聚光鏡的工作距離限制，不可過厚。在這些設計條件下冷凍臺座之設計如圖二所示，臺座可分為兩部分，前端是樣本觀察處，在凹槽中放置有熱源和熱淵、加熱電路和液態氮管路。臺座底可與顯微鏡連結，以六角螺絲固定，並可使聚光

鏡通過以縮短與物鏡間之距離。後端放置導螺桿及其基座，以控制熱源和熱淵的移動。步進馬達因高度關係另行設計其底座並與冷凍臺座組合。



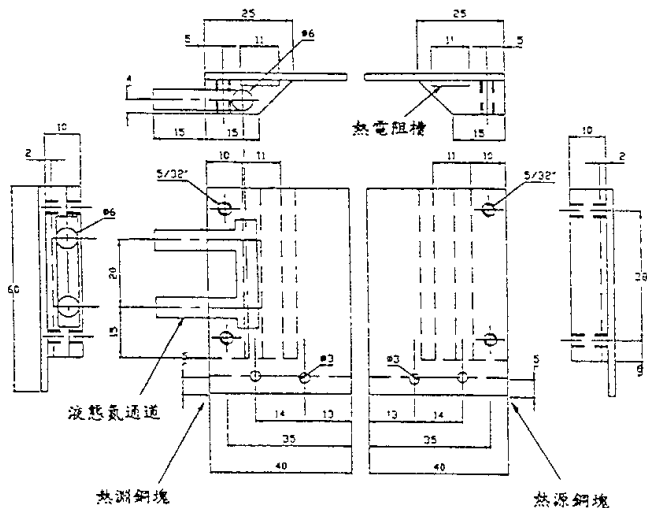
圖二 冷凍臺座設計圖

(三) 熱源和熱淵及其溫度控制系統

熱源和熱淵及溫度控制系統包括玻片兩端的熱源、熱淵銅塊，及維持銅塊溫度的熱電偶、加熱電路與溫度控制器。熱源和熱淵由10mm的銅塊與2mm的銅板組成，其設計圖如圖三所示。加熱電阻的厚度約為2mm，夾在銅塊與銅板間之凹槽以加熱銅塊與銅板，控制銅塊與銅板的溫度。在熱淵中有直徑6mm的通道，以流通液態氮產生低溫。由於顯微鏡解析度的限制，聚光鏡的光源要儘量接近物鏡。因此兩銅塊間距離為38mm，使得聚光鏡得以更接近物鏡。

熱源和熱淵的溫控系統架構可分為感測器、加熱器與溫度控制器三部分。系統中量測溫度的感測器是採用熱電偶，將熱源和熱淵的溫度回饋給溫度控制器，再由溫度控制器送控制訊號至加熱器。加熱器是以加熱電阻將電能轉成熱能，藉控制電流的大小以控制熱源和熱淵的溫度。加熱電阻的電阻值為206Ω。在110V的交流電下，功率為59W。因加熱電阻並沒有防潮處理，在

低溫下空氣中的水氣會凝結在加熱電阻上，造成短路的可能。所以加熱電阻放置於熱源和熱淵銅塊中時，於加熱電阻外另加防水矽膠，並以金屬膠與銅塊膠合。



圖三 方向式冷凍臺之熱源和熱淵設計圖

熱源銅塊溫度控制採用一般之指撥式溫度控制器（友正電機公司，型號 677 溫度控制器），而熱淵因其控溫範圍為零下之低溫，且其溫度控制受空氣對流、加熱器與液態氮三者影響，因此採用具有 PID 控制功能之控制器（衛司特公司，型號 2052 溫度控制器）。

(四) 樣本區溫度擷取

承載樣本玻片藉熱源和熱淵的移動可改變其溫度，所以對於樣本的控溫方式是以樣本溫度與設定溫度的差值，於微電腦中應用控制法則來決定熱源和熱淵的移動距離。玻片樣本溫度讀取是以溫度訊號處理器（巨騰科技公司，IOSMART 處理器）先將熱電偶讀取之電壓值轉換成數位訊號，透過 RS232 通訊界面傳輸至微電腦中進行溫度換算。玻片上讀取樣本溫度的熱電偶必須細薄使冷凍實驗進行時能於細胞樣本上安置蓋玻片，因此選用厚度 $5\mu\text{m}$ 的薄片熱電偶 (RDF Corporation, T-Type Part No.20102-1, U.S.A.)。薄片熱電偶則是以應變規黏著劑 (Kyowa Electronic Instruments Co., Ltd., CC-33A Strain Gage Cement, Japan) 固定於放置樣本的玻片上。

(五) 熱源和熱淵定位機構及驅動電路

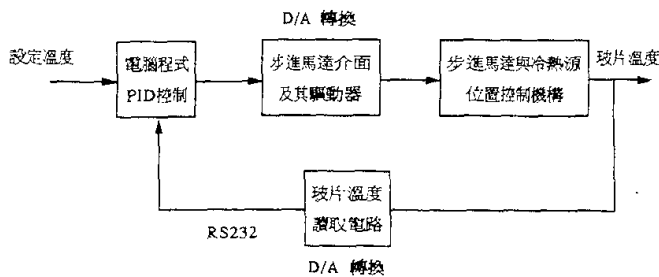
熱源和熱淵單軸定位機構是以步進馬達與導螺桿等組成。包括步進馬達與導螺桿之間的連軸器，使步進馬達的轉速與步數成為滾珠軸承的速度與位移。另外連結滾珠軸承與熱源和熱淵的電木連結塊，使軸承、熱源和熱淵成為一剛體結構，因此導螺桿上軸承的速度與位移即是熱源和熱淵的速度與位移。軸承兩端有微動開關控制熱源和熱淵的移動極限，以避免滾珠軸承與臺座之碰撞。因熱源和熱淵間距離為 4mm，樣本在兩源之間隙移動，移動距離全長也就設計為 4mm。為增加定位控制的解析度，導螺桿的導程需要比較小，且定位機構需放置於冷凍臺座上，導螺桿不可過大，所以選用之導螺桿導程為 1mm，工作範圍為 44mm (NSK 公司，型號 W0400MA)。步進馬達一圈可分為 400 步，平均一步為 0.9° 。配合導螺桿一圈導程 1mm，所以定位機構的解析度可達 0.0025mm。進行實驗時，樣本從熱源移動到熱淵可分為 1600 步。若玻片兩端溫差 80°C ，則平均移動一步樣本降溫 0.05°C ，符合實驗要求的精度。

熱源和熱淵位置的調整是以微電腦之程式透過單軸定位卡（建昇自動化公司，型號 PDC-9110）對步進馬達驅動器（建昇自動化公司，Q-MATE 型）及步進馬達（建昇自動化公司，Q-SYNC 型）進行控制。電腦程式指令單軸定位卡送出脈波到步進馬達驅動器，輸入驅動器一個脈波可驅動步進馬達步行一步 0.9° 。輸入的脈波頻率為步進馬達的轉速，而脈波數即是步進馬達步數。單軸定位卡送出控制步進馬達轉動步數及轉速的信號後，經驅動電路帶動步進馬達轉動，因導螺桿上滾珠軸承與熱源和熱淵為一剛體，藉步進馬達帶動導螺桿上滾珠軸承的移動做熱源和熱淵的單軸定位，從而改變樣本與熱源和熱淵的相對位置，以達到調整溫度之目的。

(六) 玻片樣本溫度控制

玻片溫度控制系統是利用樣本溫度讀取、熱源和熱淵定位控制與電腦界面連線組合而成，是一個數位控制系統，其方塊圖如圖四所示。進行溫度控制時，於微電腦中之控制軟體輸入欲控制的樣本溫度，即所謂的目標值。溫度訊號處理器

將類比的熱電偶電壓轉換成數位溫度信號，再由 RS-232 通訊界面傳送至微電腦。控制程式則依傳回之實測樣本溫度利用數位 PID 控制法則計算目標溫度值與實測溫度之差，來產生消去偏差的控制信號（即步進馬達轉動步數），再透過步進馬達單軸定位卡驅動步進馬達轉動，控制玻片位置而達到控溫的結果。

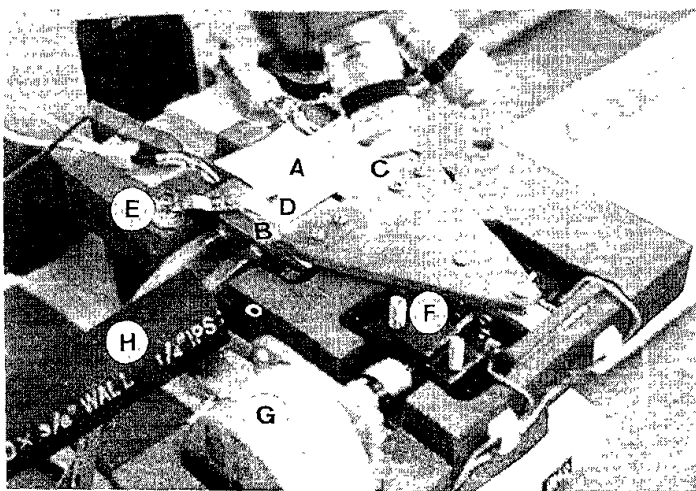


圖四 冷凍臺樣本之溫度控制方塊圖

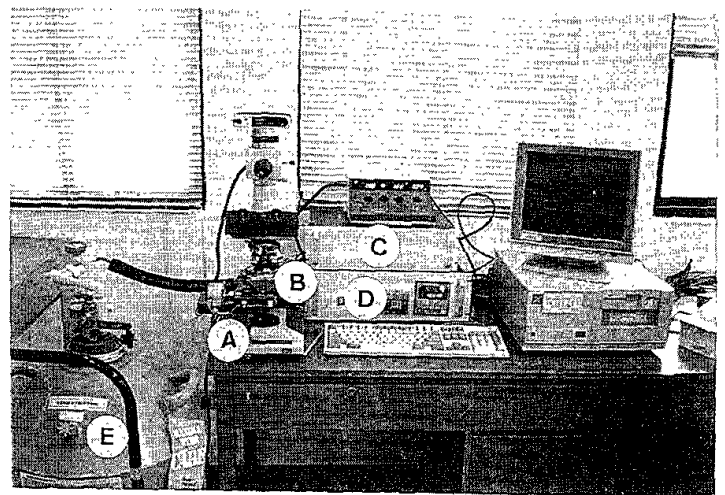
四、系統測試與實驗

(一) 溫度控制與測試

冷凍臺各元件製作完成後，首先進行各元件的連線與初步測試工作，於各部分均可正常運轉後，進行整個系統的組合作業。圖五所示為冷凍臺組成後之實體圖，各元件之位置如圖中英文字母所標記與說明。圖六所示則為整個低溫顯微鏡系統之硬體組成。



圖五 冷凍臺組成實體圖：(A).樣本區薄片熱電偶，(B).熱淵，(C).熱源，(D).樣本玻片，(E).玻片固定架，(F).螺桿與滾珠軸承，(G).步進馬達，(H).液態氮流入管路



圖六 方向式低溫顯微鏡系統組成實體圖：(A).顯微鏡本體，(B)冷凍臺，(C).步進馬達驅動器與溫度訊號處理器，(D).熱源和熱淵溫度控制器，(E).液態氮筒

冷凍臺之溫度控制程式以 C 語言撰寫，主要分為方便使用者操作此系統之使用者界面，以及負責溫度控制法則運算與傳送指令之溫度控制核心。由於樣本玻片熱傳性質之影響，在本系統中單純應用 PID 控制法則，於等速降溫時有穩態誤差產生，所以在控制策略的設計上，將模型規範 (Model reference) 控制的概念加到 PID 控制策略中，即以熱源和熱淵移動後樣本溫度的變化，預測下一時刻樣本的溫度，將此預測之溫度值加入 PID 控制策略中，以減低樣本溫度的穩態誤差 (謝明勳，1987)。

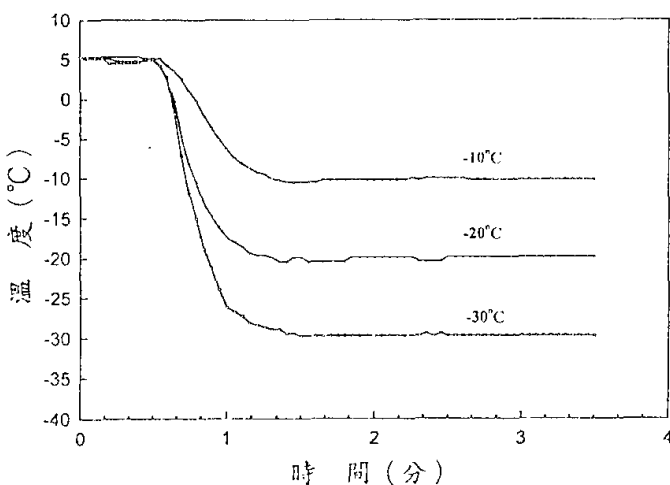
由於應用低溫顯微鏡系統的實驗，其溫度控制多是以恆溫控制與定速率升降溫為主，故於溫度控制程式中分別以兩組控制參數與策略進行恆溫與定速率升降溫兩種形式之溫度控制。於恆溫控制時直接應用標準之數位 PID 控制法則 (Bennett, 1988)，於定速率升降溫時，則應用加入模型規範概念之 PID 控制法則，應用此法則的熱源和熱淵於 k 時間之位移 $d(k)$ 是以下式計算而得 (龍侃，1993)：

$$d(k) = K_p[y(k-1) - y(k+1)] + K_i[r(k) + r(k-1) - y(k) - y(k-1)] + K_d[y(k-1) + y(k) - y(k+1) - y(k-2)]$$

式中 $y(k+1)$ 即是預測溫度， $r(k)$ 為 k 時間所量得之樣本溫度，餘類推。 K_p 、 K_i 與 K_d 則分

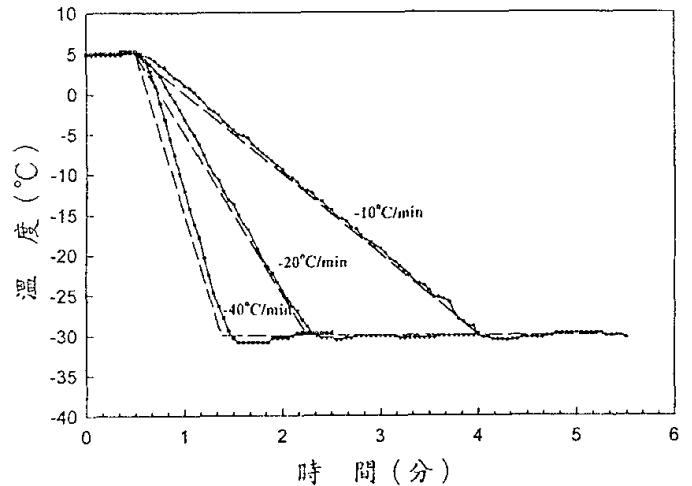
別為PID控制法則之比例、積分與微分項之控制參數。進行控溫實驗時，恆溫控制中之參數是依冷凍臺與玻片特性以公式計算，再經實驗進行小幅調整求得（龍侃，1993）。而升降溫的控制參數則是將 K_p 與 K_i 增加一倍， K_d 值不變。控制參數在必要時亦可於控制程式中重新輸入設定。

此溫度控制系統在不同零下溫度的恆溫控制測試結果如圖七所示，在熱源和熱淵溫度設定為 40°C 與 -80°C 的條件下，樣本溫度設定由 5°C 直接降溫到 -10°C 、 -20°C 與 -30°C ，到達穩態所需的時間約為三十秒左右，而到達恆溫後三組之實際溫度與設定溫度的平均平方根誤差 (Root mean squared error)，依序分別為 0.26 、 0.23 與 0.32°C ，此誤差大致相當於整個系統中熱電偶本身及類比與數位訊號轉換的解析度範圍。另外在降溫測試中，以 -10 、 -20 與 $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 三個不同的降溫速率從 5°C 降至 -30°C ，檢測系統的降溫效果，其結果如圖八所示，圖中虛線為設定之目標溫度，而連線之點為實測溫度。對各降溫過程的實測溫度進行線性迴歸，由其迴歸線之斜率可得三個實際降溫速率分別為 -10.2 、 -20.6 與 $-40.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。因玻片熱傳性質的影響，冷凍速率於 $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 時有較明顯之延遲反應。另外，在所述之熱源和熱淵溫度設定下進行在直接降溫時，冷凍速率可達 $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。而控制樣本溫度的範圍，藉調整熱源和熱淵的溫度而定，在本研究中系統可控制之溫度範圍為 -80°C 至 100°C 。



圖七 冷凍臺樣本溫度控制系統之恆溫控制實驗結果

IIF) 為細胞低溫保存過程中造成細胞損傷的主要因子之一，透過低溫顯微鏡系統對特定細胞之 IIF 現象進行觀察與記錄，將有助於建立數學預測模式，以設計或改善其低溫保存程序 (Pitt and Steponkus, 1989; 林, 1992)。



圖八 冷凍臺樣本溫度控制系統之定速率降溫控制實驗結果

細胞之 IIF 現象受時間與溫度等因子影響。一般而言，於凍結溫度下維持恆溫，IIF 之機率隨時間增長而增加，且溫度愈低 IIF 的累積頻度之增加速度愈快，這種特性已被發現於不同的生物系統中，如稻原生質體 (林, 1991)、鼠卵 (Toner et al., 1991)、牛胚胎與黑麥原生質體 (Pitt et al., 1992) 等。本研究中應用所研製的低溫顯微鏡系統觀察牡蠣卵及胚體的 IIF 特性，除用以測試系統的可用性外，亦期望藉實驗觀察，初步比較單細胞的卵與多細胞的胚體間 IIF 特性之異同。

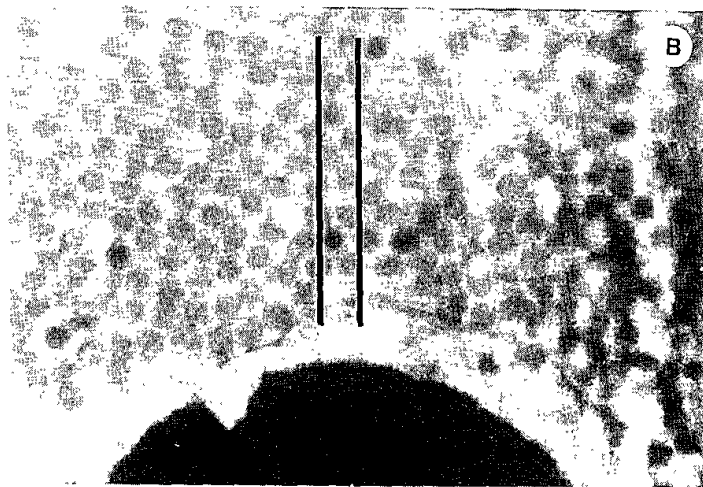
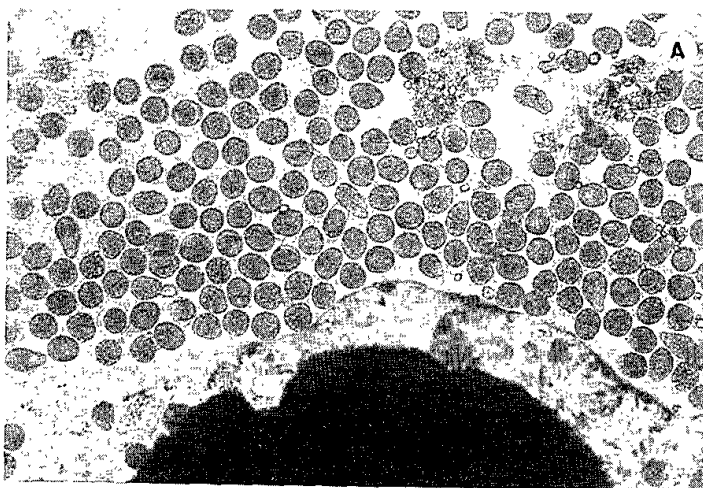
所進行的實驗為零下恆溫實驗，觀察時間因子對牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 卵及胚體產生 IIF 機率的影響。實驗之牡蠣卵與胚體均是購自市場中由產地運來之活牡蠣體解剖取得，解剖時以玻璃滴管刺入生殖腺中吸取卵或精子，胚體則為卵與精子經適量混合人工受精，放入 28°C 恆溫箱中培養四小時後 (胚體發育至近擔輪子期) 進行實驗。

在探討時間因子對牡蠣卵及胚體產生 IIF 機率的影響實驗中，卵或胚體先以吸管置於冷凍臺之樣本區後，再急速以 $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 之冷卻速率

(二) 牡蠣卵與胚體冷凍實驗

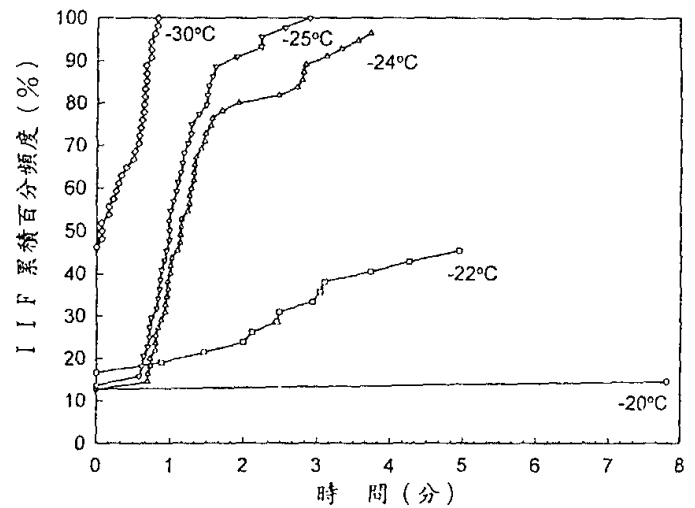
細胞內凍結 (Intracellular ice formation,

冷凍至不同的恆溫環境，然後錄影並記錄卵或胚體個別產生 IIF 之時間。圖九(A)所示為牡蠣胚體於降溫冷凍前之情況，圖九(B)則是冷凍實驗開始後於低溫之狀態，圖中下方黑色半圓為薄片熱電偶，左方為熱源方向，右方為熱淵方向，部分牡蠣的色澤有明顯的變化（尤以接近熱淵方向者為然），此即為細胞內凍結，在文獻記載稱為 Flashing 或 Darkening 的現象 (Steponkus et al., 1984)。由於方向式冷凍臺之玻片沿熱淵至熱源方向有溫度梯度之存在，在記錄卵或胚體的溫度或時間時，僅限於平行熱電偶方向且位於其中心線之小區域，即圖九(B)中所標記的兩條平行黑線內約 80 μ m 的帶狀範圍之卵或胚體方予以記錄。以減少因溫度梯度所造成的影響，在熱源和熱淵溫度設定為 40 $^{\circ}$ C 與 -80 $^{\circ}$ C 之情形下，此

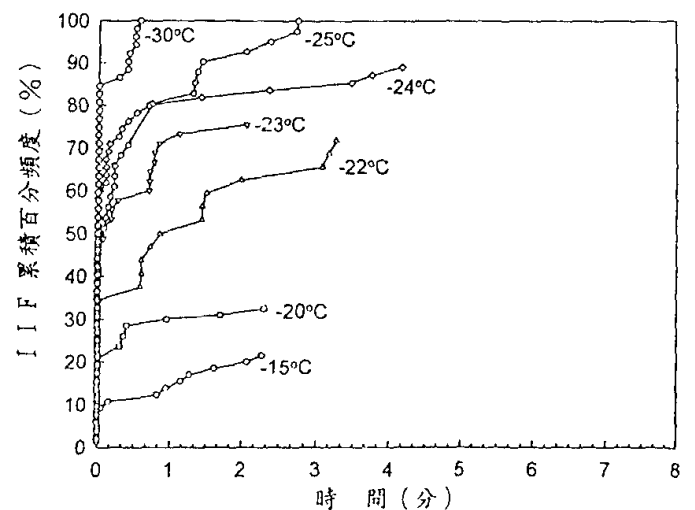


圖九 牡蠣胚體於冷凍臺上凍結前後之變化。(A)牡蠣胚體於未凍結前，(B)牡蠣胚體懸浮液凍結後部分胚體產生細胞內凍結之情形

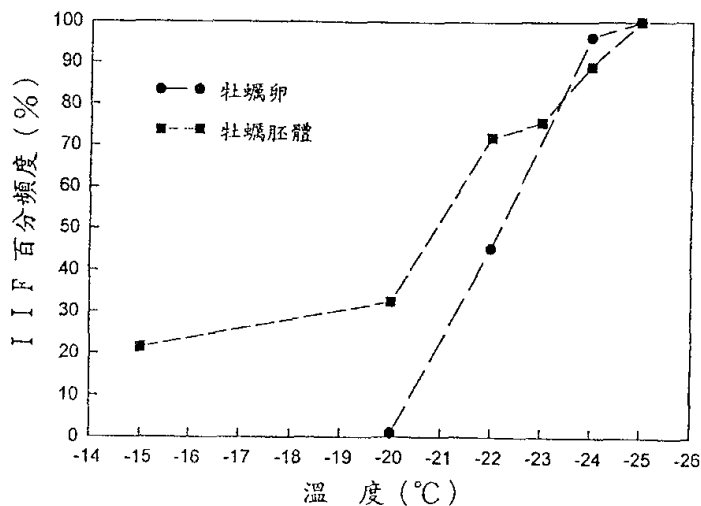
範圍內約有 1 $^{\circ}$ C 之溫差。每次實驗約可記錄近十個卵或胚體，將多次實驗的記錄統合以累積百分頻度表示，其結果如圖十與圖十一所示。由圖中資料可知牡蠣卵或胚體在低溫狀態下，隨著時間的增長，發生 IIF 的機率隨之增加，且隨著所設定的恆溫之下降，發生 IIF 的機率也隨之增加，由此可見時間與溫度同為 IIF 的重要因子。此項實驗亦顯示牡蠣胚體於 -15 $^{\circ}$ C 時即有部分 IIF 現象發生，較卵初產生 IIF 的 -20 $^{\circ}$ C 為高，未產生 IIF 之卵或胚體均可觀察到因脫水而造成體積縮小的情形。而在 -25 $^{\circ}$ C 以下，隨著時間的增加，無論卵或胚體產生 IIF 的機率均為百分之百。圖十二是對牡蠣卵與胚體在不同零下恆溫時所產生



圖十 不同零下恆溫下牡蠣卵細胞內凍結對時間的累積百分頻度



圖十一 不同零下恆溫下牡蠣胚體細胞內凍結對時間的累積百分頻度



圖十二 牡蠣卵與胚體於不同零下恆溫下產生 IIF 之百分頻度比較

IIF 之最終百分頻度進行比較，由圖中可見多細胞之胚體產生 IIF 之機率由 0 至 1 的轉變溫度範圍較單細胞之卵為寬廣。另外，胚體與卵 IIF 到達 50% 機率之溫度 ($^{50}T_{IIF}$) 分別為 -21.0°C 與 -22.5°C 左右，這兩個溫度均顯著較 Harris 等人 (1991) 所測得鼠肝細胞之 -5.0°C 為低。

五、結 論

- 一、在本研究中改良了原有方向式低溫顯微鏡冷凍臺的設計，將承載樣本的玻片固定，而以熱源和熱淵的移動調整樣本溫度，以利於樣本的長時間觀察。樣本區亦安置熱電偶以實際量測樣本的溫度，並將此溫度回饋給微電腦進行樣本溫度之控制。
- 二、改良之方向式低溫顯微鏡系統主要包括冷凍臺座、熱源和熱淵及其溫度控制系統、樣本溫度讀取界面、定位機構和驅動電路及樣本溫度控制軟體等五個部分，於研製完成後進行組合與性能測試。在熱源和熱淵溫度設定為 40°C 與 -80°C 的條件下，控制恆溫之平均平方根誤差約為 0.3°C ，冷凍速率可達 $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。而控制樣本溫度的範圍，藉由調整熱源和熱淵的溫度而定，在本研究中，系統可控制之溫度範圍為 -80°C 至 100°C 。
- 三、以所完成之低溫顯微鏡系統對牡蠣卵及胚體進行實驗，驗證了系統之可用性。同時實驗

結果顯示，牡蠣卵或胚體在低溫狀態下，隨著時間的增長，發生 IIF 的機率隨之增加，且隨著所設定恆溫之下降，發生 IIF 的機率也隨之增加。胚體產生 IIF 之機率由 0 至 1 的轉變溫度範圍較卵為寬廣，而胚體與卵之 $^{50}T_{IIF}$ 分別為 -21.0°C 與 -22.5°C 左右。

六、參考文獻

1. 林達德。1991。微電腦低溫顯微鏡系統之研製與應用。臺灣大學農學院研究報告 31(2):88-104。
2. 林達德。1992。生物細胞內凍結現象之機率模式與分析。農業機械學刊 1(4):10-21。
3. 謝明勳編譯。1987。數位控制。臺北：全華。
4. 龍侃。1993。微電腦方向式低溫顯微鏡系統之研製。碩士論文。臺北：臺灣大學農業機械工程學研究所。
5. Bennett, S. 1988. Real-time Computer Control: An Introduction. United Kingdom: Prentice Hall International (UK) Ltd.
6. Diller, K.R. 1982. Quantitative low temperature optical microscopy of biological systems. Journal of Microscopy 126:9-28.
7. Diller, K.R. and E.G. Cravalho. 1970. A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells. Cryobiology 7:191-199.
8. Harris, C.L., M. Toner, A. Hubel, E.G. Cravalho, M.L. Yarmush, and R.G. Tompkins. 1991. Cryopreservation of isolated hepatocytes: Intracellular ice formation under various chemical and physical conditions. Cryobiology 28:436-444.
9. Korber, C., M.W. Scheiwe, and K. Wollhover. 1984. A cryomicroscope for the analysis of solute polarization during freezing. Cryobiology 21:68-80.
10. Kourosh, S. and K.R. Diller. 1984. A unidirectional temperature gradient stage for solidification studies in aqueous solutions. Journal of Microscopy 135:39-48.

11. McGann, L.E. 1979. A versatile microcomputer-based temperature and cooling/warming rate controller. *Cryobiology* 16:97-100.
12. McGrath, J.J., E.G. Cravalho, and C.E. Huggins. 1975. An experimental comparison of intracellular ice formation and freeze-thaw survival of Hela S-3 cells. *Cryobiology* 12:540-550.
13. Pitt, R.E. and P.L. Steponkus. 1989. Quantitative analysis of the probability of intracellular ice formation in isolated protoplasts. *Cryobiology* 26:44-63.
14. Pitt, R.E., M. Chandrasekaran, and J.E. Parks. 1992. Performance of a kinetic model for intracellular ice formation based on the extent of supercooling. *Cryobiology* 29:359-373.
15. Rubinsky, B. and M. Ikeda. 1985. A cryomicroscope using directional solidification for the controlled freezing of biological material. *Cryobiology* 22:55-68.
16. Rubinsky, B., A. Arav, and A.L. Devries. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryo-letters* 12:93-106.
17. Shah, S.J., K.R. Diller, and S.J. Aggarwal. 1987. A personal computer-based temperature control system. *Cryobiology* 24:163-168.
18. Steponkus, P.L., M.F. Dowgert, J.R. Ferguson, and R.L. Levin. 1984. Cryomicroscopy of isolated plant protoplast. *Cryobiology* 21:209-233.
19. Toner, M., E.G. Cravalho, M. Karel, and D.R. Armant. 1991. Cryomicroscopic analysis of intracellular ice formation during freezing of mouse oocytes without cryoadditives. *Cryobiology* 28:55-71.
20. Tu, S.M. and J.J. McGrath. 1984. Computer simulation of two-dimensional transient temperature field in a cryomicroscope conduction stage. ASME 84-WA/HT-64.

收稿日期：1994年10月26日

修改日期：1994年11月17日

接受日期：1994年12月22日